

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2001年12月6日 (06.12.2001)

PCT

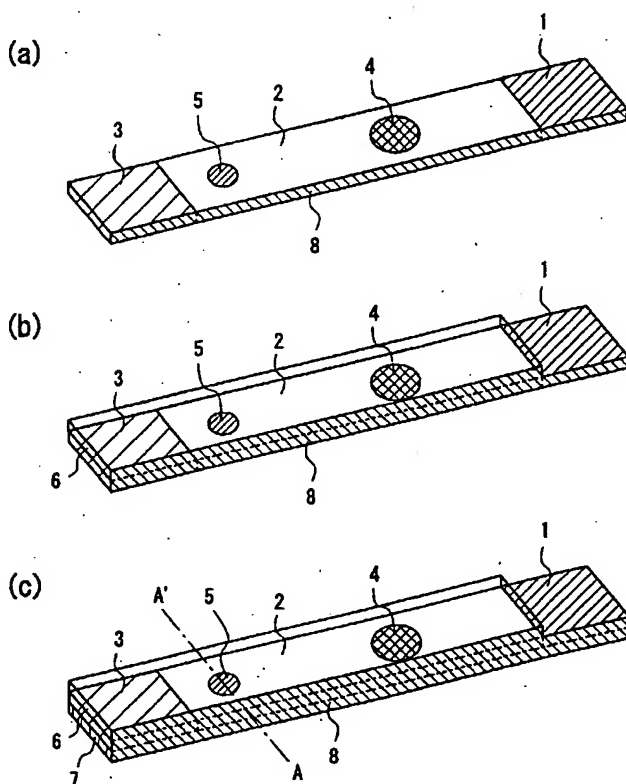
(10) 国際公開番号  
WO 01/92884 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/543 (72) 発明者: および  
(21) 国際出願番号: PCT/JP01/04498 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 瀬岡正剛  
(22) 国際出願日: 2001年5月29日 (29.05.2001) (NADAOKA, Masataka) [JP/JP]; 〒799-3113 愛媛県伊予市米湊819-5 Ehime (JP). 高橋三枝 (TAKAHASHI, Mie) [JP/JP]; 〒792-0026 愛媛県新居浜市久保田町2-13-1 Ehime (JP). 田中宏樹 (TANAKA, Hirotsuka) [JP/JP]; 〒791-1102 愛媛県松山市来住町533-1-102 Ehime (JP). 北脇文久 (KITAWAKI, Fumihisa) [JP/JP]; 〒571-0064 大阪府門真市御堂町25-3-211 Osaka (JP).  
(25) 国際出願の言語: 日本語  
(26) 国際公開の言語: 日本語  
(30) 優先権データ: 特願2000-158759 2000年5月29日 (29.05.2000) JP  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 松下電器産業株式会社 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒571-8501 大阪府門真市大字門真1006番地 Osaka (JP).  
(74) 代理人: 弁理士 早瀬憲一 (HAYASE, Kenichi); 〒564-0053 大阪府吹田市江の木町17番1号 江坂全日空ビル8階 早瀬特許事務所 Osaka (JP).  
(81) 指定国 (国内): CN, JP, KR, US.

[続葉有]

(54) Title: BIOSENSOR AND METHOD FOR ITS PREPARATION

(54) 発明の名称: バイオセンサ及びその製造方法



(57) Abstract: A biosensor which has a developing layer comprising a reagent fixing section (5) for fixing an antibody against a substance to be measured in a solution to be tested and a reagent holding section (4) for holding the above antibody being in a dry and labeled state and eluted by the development of the solution to be tested and which determines the substance to be measured in the solution to be tested qualitatively or quantitatively by measuring the amount of the labeled reagent bound to the reagent fixing section (5), characterized in that the side surface of the developing layer which is parallel with the direction of permeation of the solution to be tested has been partly or wholly hardened and closed through melting; and a method for preparing the biosensor. The biosensor allows appropriate arrangement and adjustment of the permeation of the solution to be tested in the developing layer and also allows provision of a precise biosensor at a low cost.

[続葉有]



(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

---

(57) 要約:

本発明のバイオセンサは、被検査溶液を展開する展開層の一部に、上記被検査溶液中の測定対象物に対する抗体を固定化している試薬固定化部（５）と、上記展開層の一部に乾燥状態で標識し、上記被検査溶液の展開により溶出可能な抗体を保持している標識試薬保持部（４）とを含み、上記試薬固定化部（５）において結合した標識試薬の結合量を測定することにより、上記被検査溶液中の測定成分を定性もしくは定量するバイオセンサにおいて、上記展開層は上記被検査溶液の浸透方向に対して平行側面の一部もしくは全体部分を溶融硬化して密閉するものとした。

このような構成を有するバイオセンサによれば、展開層における被検査溶液の浸透を整え、またその簡易な製造方法により、低コストかつ高精度なバイオセンサ及びその製造方法を実現できる。

## 明 細 書

## バイオセンサ及びその製造方法

## 5 技術分野

本発明は、バイオセンサに関し、特にクロマトグラフィーを利用したバイオセンサ及びその製造方法に関する。

## 背景技術

- 10 従来のバイオセンサは、被検査溶液を展開する展開層を備え、該展開層の一部には、試薬が固定化された試薬固定化部分と、標識された試薬が乾燥状態で保持され、被検査溶液の展開により溶出可能な試薬保持部分とを含み、上記試薬固定化部分における標識試薬の結合量を測定することにより、被検査溶液中の測定成分を定性もしくは定量するものである。このよ
- 15 うなバイオセンサの例として、イムノクロマトセンサがある。
- イムノクロマトセンサの一般的な構成は、被検査溶液を添加する添加層と、複数の展開層と、終端に吸収層とを備えるものであり、この展開層の一部に被検査溶液中の測定対象物に対する抗体を固定化している抗体固定化部を有する。さらに、その抗体固定化部よりも添加層側に標識され、該
- 20 抗体固定化部に固定化された抗体とは異なるエピトープに対する抗体が、被検査溶液により溶出可能な乾燥状態で標識試薬保持部に保持されている。このようなクロマトセンサの反応形態は、サンドイッチ反応といわれるものであり、固定化された抗体と、被検査溶液中の測定対象物と、標識された抗体とのサンドイッチ複合体が形成される。なお、上記被検査溶液が、
- 25 同一分子内に同一構造を持つ、例えば2量体以上の抗原である場合には、上記標識試薬保持部に、上記固定化された抗体と異なるエピトープに対する抗体を保持する必要はなく、該固定化された抗体と同じエピトープに対する抗体を保持するようにしてもよい。

次に、このようなイムノクロマトセンサを用いた測定方法について説明する。

- まず、添加層に被検査溶液を必要量添加すると、被検査溶液が展開層中に浸透して、測定が開始する。そして、上記抗体固定化部において、その
- 5 固定化抗体と結合した標識抗体により、測定結果が検出される。この標識抗体の一般的な標識物としては金コロイド粒子等があり、このように抗体を金コロイド粒子等で標識することによって、抗体固定化部における測定対象物と抗体との結合が金コロイド粒子により目視可能となり、目視により測定結果を得ることができる。
- 10 なお、ここでは抗原抗体反応のサンドイッチ反応を測定原理とした場合を述べたが、その他に、競合反応を測定原理とすることも可能である。この場合も同様に、抗体固定化部（もしくは、測定対象物が抗体である場合には抗原固定化部）における標識抗体の結合状態を確認することで測定結果を得ることができる。
- 15 また、測定結果を得る方法として、ここでは目視による定性判定を必要とする場合を述べたが、必要とされる測定結果が半定量もしくはそれよりも精度の高い判定が必要とされる場合には、一般的な反射分光光度計であるデンシトパターンアナライザなどを用いて反射吸光度を読み取る方法、あるいは、特開平10-274624号公報に開示されている、光学的な
- 20 読み取り装置を用いて透過方式により読み取る方法、特開平10-274653号公報に開示されている、カメラなどで測定結果を画像として取り込み、演算処理する方法などもある。
- このようなイムノクロマトセンサは、近年の医療診断現場における、POC（ポイント・オブ・ケア）の概念による、迅速、簡便、正確、さらには
- 25 低価格で容易に入手可能な測定装置の要望に応じるものとして、その測定操作の簡便さから、医療現場のみならず、一般家庭においても、限定された測定項目の診断などに広く利用されている。

しかしながら、イムノクロマトセンサを用いた測定は、被検査溶液が浸

- 透する過程において、人為的な操作が困難、つまり展開層の有する浸透性に依存しなければならないものであり、このことは、イムノクロマトセンサの利点である操作性の簡便をうむ一方、精度面において欠点になっていた。つまり、展開層の平行側面が開放されているイムノクロマトセンサは、
- 5 被検査溶液の浸透速度が不均一であり、そのような状況下においては、測定対象物の展開が不均一になるばかりか、標識試薬の展開も不均一になり、高精度な定量精度を得ることは困難であった。また、このような構成を有するイムノクロマトセンサでは、定性もしくは定量精度の低い半定量の性能しか有することができず、測定を行うには低精度の測定項目の使用に限定
- 10 されていた。さらに、展開層の平行側面が開放されていることによって、被検査溶液の状態にも影響が与えられることとなり、例えば血液成分などを被検査溶液とした場合には、高精度な測定がさらに困難になるため、被検査溶液の種類も限定される要因となっていた。

- この課題の解決策として、特開 2001-66310 号公報に、クロマト
- 15 トグラフィデバイスの展開層の表面及び平行側面に、液体不透過性シートを密着被覆させることによって、被検査溶液の浸透状態を整流させるようにし、より高精度な測定を達成するクロマトグラフィ定量測定装置が開示されている。

- しかし、上記特開 2001-66310 号公報に開示されているクロマト
- 20 トグラフィデバイスにおいては、組立工法上、煩雑な操作を必要とするのみならず、例えば、展開層に十分薄いメンブレンなどを使用する場合、被検査溶液を添加する部分の平行側面を密閉する操作が煩雑になる、という問題があった。

- また、イムノクロマトセンサの展開層を量産する工法としては、展開層
- 25 上に試薬成分を一括して形成し、最終的に、展開層を切断分離するのが一般的とされており、この方法で上記特開 2001-66310 号公報に開示されている、クロマトグラフィデバイスであるイムノクロマトセンサを作製すると、平行側面を密閉することができず、その平行側面を密閉する

ために切断後のイムノクロマトセンサー個一個を個別に作製せざるおえない、という問題があった。また、このような平行側面をテープなどの液体不透過性シートで一個一個密閉する作業には煩雑な作業が必要とされ、さらに、その構成を得るための材料も必要とされるため、結果的に高コストになる、という問題があった。

さらに、上述した展開層を一括して形成する工法においては、展開層の被検査溶液の展開方向に対して横断する形態で、試薬成分が形成される。そして、上記工法によって形成され、平行側面が解放されている構成のイムノクロマトセンサでは、展開層の不均一な被検査溶液の浸透が生じた場合、展開層の平行側面部分の流速に変化が生じ易く、結果的に、標識試薬及び被検査溶液中の測定対象物が、上記試薬固定化部分を通過する量に変化してしまい、該試薬固定化部分で結合する標識試薬成分の量が試薬固定化部分の中央部と平行側面部分とで不均一になり、測定精度を低下させる、という問題があった。そして、このような問題が生じる原因としては、展開層を一括して形成する製造工法等の、展開層を切断する工程を含む製造工法における切断手法が、カッター、はさみ、金型プレス、ギロチンカッター、ロータリーカッター、スコアカッターなどの刃物によるものであることが挙げられる。つまり、刃物によって上記展開層を切断するには、該展開層に接触して切断しなければならず、しかも展開層には、一般的に不織布、ガラス繊維、セルロース繊維、メンブレンなど、接触圧に対して形状変化を生じる材料を使用している場合が多いので、切断するときに形状変化が不均一になってしまい、測定における不均一な浸透を生じさせることとなっていた。

本発明は、かかる問題点を解消するためになされたものであり、展開層における被検査溶液の浸透を整えることができ、また製造方法が簡易な、低コストかつ高精度なバイオセンサ及びその製造方法を提供することを目的とする。

## 発明の開示

本発明の請求の範囲第1項に記載のバイオセンサは、被検査溶液を展開する展開層を備え、該展開層の一部に固定化された固定化試薬部分と、標識された乾燥状態で上記展開層の一部に保持され、上記被検査溶液の展開により溶出可能な標識試薬部分とを含み、上記固定化試薬部分における上記標識試薬の結合量を測定することにより、上記被検査溶液中の測定成分を定性もしくは定量するバイオセンサにおいて、上記展開層の、上記被検査溶液の浸透方向に対して平行である側面の一部分もしくは全体が、溶融硬化され密閉されているものである。

10 これにより、被検査溶液の浸透を整えて、より精度の高い定量測定を可能にするばかりでなく、平行側面の密閉に、新たな材料を必要とせず、製造過程を簡素化することを可能にし、材料削減と製造工数削減による低コスト化を図ることができ、より高精度かつ低コストなバイオセンサを提供できる。

15 本発明の請求の範囲第2項に記載のバイオセンサは、被検査溶液を展開する展開層を備え、該展開層の上記被検査溶液の浸透方向に対して平行側面を含む一部に固定化された固定化試薬部分と、標識された乾燥状態で上記展開層の浸透方向に対して平行側面を含む一部に保持され、上記被検査溶液の展開により溶出可能な標識試薬部分とを含み、上記固定化試薬部分における上記標識試薬の結合量を測定することにより、上記被検査溶液中の測定成分を定性もしくは定量するバイオセンサにおいて、上記展開層は、上記被検査溶液の浸透方向に対して、上記標識試薬部分の平行側面と上記固定化試薬部分の平行側面とにおける試薬成分を変性失活されているものである。

25 これにより、上記展開層の側面部分の不均一な被検査溶液の浸透に起因する、上記固定化試薬部分での測定精度の低下を防止できるバイオセンサを提供することができる。

本発明の請求の範囲第3項に記載のバイオセンサは、請求の範囲第2項



に記載のバイオセンサにおいて、上記展開層の、上記被検査溶液の浸透方向に対して平行である側面の一部分もしくは全体が、熔融硬化され密閉されているものである。

- これにより、上記展開層の側面部分の不均一な被検査溶液の浸透に起因
- 5 する上記固定化試薬部分での測定精度の低下を防止でき、さらに、上記被検査溶液の浸透を整えて、より精度の高い定量測定を可能にする、より高精度なバイオセンサを提供することができる。また、上記平行側面の密閉に、新たな材料を必要とせず、製造過程を簡素化することを可能にし、材料削減と製造工数削減による低コスト化を図ることができるバイオセンサ
- 10 を提供することができる。

- 本発明の請求の範囲第4項に記載のバイオセンサは、請求の範囲第1項
- ないし請求の範囲第3項のいずれかに記載のバイオセンサにおいて、上記展開層の、上記被検査溶液を添加する一部を除いた表面、または表面及び裏面が、液体不透過性シートで覆われており、上記展開層及び上記液体不
- 15 透過性シートの、上記被検査溶液の浸透方向に対して平行である側面の一部分もしくは全体が、熔融硬化され密閉されているものである。

これにより、上記展開層の表面、裏面、さらには上記平行側面を密閉し、上記被検査溶液の誤った添加を防止することで、正確性の高い測定を可能にする、正確性の高いバイオセンサを提供できる。

- 20 本発明の請求の範囲第5項に記載のバイオセンサは、請求の範囲第1項ないし請求の範囲第3項のいずれかに記載のバイオセンサにおいて、上記展開層の、上記被検査溶液を添加する方向に対する始端及び終端の一部を除いた表面、または表面及び裏面が、上記液体不透過性シートで覆われており、上記展開層及び上記液体不透過性シートの、上記被検査溶液の浸透
- 25 方向に対して平行である側面の一部分もしくは全体が、熔融硬化され密閉されているものである。

これにより、上記展開層の表面、裏面を液体不透過性シート材が覆うため、液体を遮断し、さらには上記平行側面を熔融硬化密閉することで遮断

- し、上記被検査溶液の誤った添加を防止することで、正確性の高い測定を可能にする。また、上記展開層の被検査溶液の展開方向に対して終端部の開放により、水分蒸発さらには、添加部に残存する被検査溶液との水頭差の関係により、被検査溶液は乾燥するまで下流方向に向かって浸透し続ける効果があり、余分な被検査溶液の吸収させるための吸収部材を不要にでき、よりシンプルな構成をとる、低コスト且つ正確性の高いバイオセンサを提供できる。

- 本発明の請求の範囲第6項に記載のバイオセンサは、請求の範囲第1項ないし請求の範囲第3項のいずれかに記載のバイオセンサにおいて、上記展開層はニトロセルロースで構成されているものである。

これにより、作製操作が容易にできるバイオセンサを提供できる。

本発明の請求の範囲第7項に記載のバイオセンサは、請求の範囲第1項ないし請求の範囲第3項のいずれかに記載のバイオセンサにおいて、上記展開層の平行側面は、レーザーによって溶融硬化され密閉されるものである。

- これにより、上記展開層の平行側面の必要な部分を、より高速に、且つ均一に溶融硬化させることができ、溶融硬化させた部分に均一性をもたせた、より高精度なバイオセンサを提供することができる。

- 本発明の請求の範囲第8項に記載のバイオセンサは、請求の範囲第1項ないし請求の範囲第3項のいずれかに記載のバイオセンサにおいて、上記固定化試薬及び標識試薬を含む当該センサ全体が乾燥状態である。

これにより、保存安定性能に優れ、また、持ち運び自在となるバイオセンサを提供することができる。

- 本発明の請求の範囲第9項に記載のバイオセンサは、請求の範囲第1項ないし請求の範囲第3項のいずれかに記載のバイオセンサにおいて、上記バイオセンサは、湿潤可能な多孔質材料上で上記固定化試薬と上記標識試薬との複合体を形成することにより測定が行われる免疫クロマトグラフィの試験片である。

これにより、簡易法として市場に広がりつつある免疫クロマトグラフィ

において、高精度、且つ正確性の高い免疫クロマトグラフィを提供できる。

本発明の請求の範囲第10項に記載のバイオセンサは、請求の範囲第1項ないし請求の範囲第3項のいずれかに記載のバイオセンサにおいて、上記バイオセンサは、湿潤可能な多孔質材料上で、上記被検査溶液の添加操作により測定がされるワンステップ免疫クロマトグラフィの試験片である。

これにより、簡易免疫測定法として市場に普及しつつあるワンステップ免疫クロマトグラフィにおいて、高精度かつ正確性の高いワンステップ免疫クロマトグラフィを提供できる。

本発明の請求の範囲第11項に記載のバイオセンサは、請求の範囲第10項ないし請求の範囲第3項のいずれかに記載のバイオセンサにおいて、上記固定化試薬と上記標識試薬とは、同一平面、かつ同一部材上に形成されているものである。

これにより、上記バイオセンサをより少ない材料で構成して、低コスト化シンプル構成を図り、シンプルな構成により測定値のバラツキを低減させて、測定の精度を向上させた、正確性の高いバイオセンサを提供できる。

本発明の請求の範囲第12項に記載のバイオセンサの製造方法は、被検査溶液を展開する展開層を備え、該展開層の一部に固定化された固定化試薬部分と、標識された乾燥状態で上記展開層の一部に保持され、上記被検査溶液の展開により溶出可能な標識試薬部分とを含み、上記固定化試薬部分における上記標識試薬の結合量を測定することにより、上記被検査溶液中の測定成分を定性もしくは定量するバイオセンサを製造する方法において、上記展開層の、上記被検査溶液の浸透方向に対して平行である側面的一部分もしくは全体を、溶融硬化して密閉する溶融工程を含むものである。

これにより、上記展開層そのものの平行側面を溶融硬化密閉させて、側面を密閉させるのに新たに材料が必要ないようにでき、より低コストなバイオセンサを作製することができる。

本発明の請求の範囲第13項に記載のバイオセンサの製造方法は、請求の範囲第12項に記載のバイオセンサの製造方法において、上記溶融工程

は、上記展開層の上記側面の一部分あるいは全体に、レーザを照射することで行われるものである。

- これにより、上記展開層の側面に対し物理的に非接触で溶融硬化させることができ、上記展開層の接触圧による形状変化を生じない、高精度なバイオセンサを作製することができる。

- 本発明の請求の範囲第14項に記載のバイオセンサの製造方法は、被検査溶液を展開する展開層を備え、該展開層の一部に固定化された固定化試薬部分と、標識された乾燥状態で上記展開層の一部に保持され、上記被検査溶液の展開により溶出可能な標識試薬部分とを含み、上記固定化試薬部分における上記標識試薬の結合量を測定することにより、上記被検査溶液中の測定成分を定性もしくは定量するバイオセンサを製造する方法において、シート状である上記展開層を、上記被検査溶液の浸透方向に対して平行に切断すると同時に、該展開層の切断面を溶融硬化して密閉する、切断溶融工程を含むものである。

- 15 これにより、上記シート状の展開層を切断しながら、同時に該側面を溶融硬化させて密閉することで、より高精度な、また新たに密閉する操作を必要としない、簡易且つ低コストなバイオセンサを作製することができる。

- 本発明の請求の範囲第15項に記載のバイオセンサの製造方法は、請求の範囲第14項に記載のバイオセンサの製造方法において、上記切断溶融工程は、上記シート状の展開層をレーザでトリミングすることで行われるものである。

- これにより、上記シート状である展開層をレーザでトリミングする過程で、上記展開層の平行側面を溶融硬化して密閉することで、より高精度な、また新たに密閉する操作を必要としない、簡易且つ低コストなバイオセンサを作製することができる。また、上記展開層の側面に対し、物理的に非接触で溶融硬化させることができ、上記展開層の接触圧による形状変化を生じない、高精度なバイオセンサを作製することができる。

本発明の請求の範囲第16項に記載のバイオセンサの製造方法は、被検

査溶液を展開する展開層を備え、該展開層の上記被検査溶液の浸透方向に対して平行側面を含む一部に固定化された固定化試薬部分と、標識された乾燥状態で上記展開層の浸透方向に対して平行側面を含む一部に保持され、上記被検査溶液の展開により溶出可能な標識試薬部分とを含み、上記固定化試薬部分における上記標識試薬の結合量を測定することにより、上記被検査溶液中の測定成分を定性もしくは定量するバイオセンサを製造する方法において、上記標識試薬部分、及び上記固定化試薬部分の、上記被検査溶液の浸透方向に対して平行である側面における試薬成分を変性失活する変性失活工程を含むものである。

- 5  
10 これにより、上記展開層の平行側面周辺の、試薬成分を変性失活させることができ、該展開層の側面における、不均一な被検査溶液の浸透に起因する測定精度の低下を防止したバイオセンサを作製することができる。

本発明の請求の範囲第17項に記載のバイオセンサの製造方法は、請求の範囲第16項に記載のバイオセンサの製造方法において、上記変性失活  
15 工程は、上記側面にレーザを照射することで行われるものである。

これにより、上記展開層の平行側面に対して、非接触で試薬成分を変性失活することができ、より高精度なバイオセンサを作製することができる。

- 本発明の請求の範囲第18項に記載のバイオセンサの製造方法は、被検査溶液を展開する展開層を備え、該展開層の上記被検査溶液の浸透方向に対して平行側面を含む一部に固定化された固定化試薬部分と、標識された乾燥状態で上記展開層の浸透方向に対して平行側面を含む一部に保持され、上記被検査溶液の展開により溶出可能な標識試薬部分とを含み、上記固定化試薬部分における上記標識試薬の結合量を測定することにより、上記被検査溶液中の測定成分を定性もしくは定量するバイオセンサを製造する方法において、上記展開層の、上記被検査溶液の浸透方向に対して平行である側面的一部分もしくは全体を、溶融硬化して密閉すると同時に、上記標識試薬部分、及び上記固定化試薬部分の、上記被検査溶液の浸透方向に対して平行である側面における試薬成分を変性失活させる、溶融失活工程を  
20  
25

含むものである。

これにより、上記展開層を溶融硬化させ密閉すると同時に、該平行側面の試薬成分を変性失活させることができ、一度の操作で行うことが可能な、より簡易で、且つ高精度なバイオセンサを作製することができる。

- 5 本発明の請求の範囲第19項に記載のバイオセンサの製造方法は、請求の範囲第18項に記載のバイオセンサの製造方法において、上記溶融失活工程は、上記側面にレーザを照射することで行われるものである。

- 10 これにより、上記展開層の側面に対し、物理的に非接触で溶融硬化させることができ、上記展開層の接触圧による形状変化を生じない、高精度なバイオセンサを作製することができる。

- 15 本発明の請求の範囲第20項に記載のバイオセンサの製造方法は、被検査溶液を展開する展開層を備え、該展開層の上記被検査溶液の浸透方向に対して平行側面を含む一部に固定化された固定化試薬部分と、標識された乾燥状態で上記展開層の浸透方向に対して平行側面を含む一部に保持され、上記被検査溶液の展開により溶出可能な標識試薬部分とを含み、上記固定化試薬部分における上記標識試薬の結合量を測定することにより、上記被検査溶液中の測定成分を定性もしくは定量するバイオセンサを製造する方法において、シート状である上記展開層を、上記被検査溶液の浸透方向に対して平行に切断すると同時に、該展開層の切断面を溶融硬化し、密閉、  
20 且つ、上記標識試薬部分、及び上記固定化試薬部分の、上記側面における試薬成分を変性失活させる、切断溶融失活工程を含むものである。

- これにより、上記展開層を切断すると同時に、展開層を溶融硬化させて密閉し、さらに、同時工程で平行側面の試薬成分を変性失活させることができ、一度の操作で切断、溶融、変性失活を行うことが可能な、より簡易  
25 で、低コスト、且つ高精度なバイオセンサを作製することができる。

本発明の請求の範囲第21項に記載のバイオセンサの製造方法は、請求の範囲第20項に記載のバイオセンサの製造方法において、上記切断溶融失活工程は、上記シート状である展開層をレーザでトリミングすることで

行われるものである。

- これにより、上記展開層を切断すると同時に、展開層を溶融硬化させて密閉し、さらに、同時工程で平行側面の試薬成分を変性失活させることができ、一度の操作で切断、溶融、変性失活を行うことが可能な、より高精度な、簡易且つ低コストなバイオセンサを作製することができる。また、上記展開層の側面に対し、物理的に非接触で溶融硬化させることができ、上記展開層の接触圧による形状変化を生じない、高精度なバイオセンサを作製することができる。

#### 10 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の実施の形態1におけるバイオセンサの構成を示す斜視図である。

第2図は、本発明の実施の形態2におけるバイオセンサの構成を示す斜視図である。

- 15 第3図は、本発明の実施の形態3におけるバイオセンサの構成を示す斜視図である。

第4図は、本発明の実施の形態4における、試薬固定化部が展開層の平行側面に接触していないバイオセンサの切断前後の断面の構成を示す図である。

- 20 第5図は、本発明の実施の形態4における、試薬固定化部が展開層の平行側面に接触しているバイオセンサの切断前後の断面の構成を示す図である。

第6図は、従来における切断工程によって切断された、バイオセンサの断面の顕微鏡写真である。

- 25 第7図は、本発明の実施の形態4における切断工程によって切断された、バイオセンサの断面の顕微鏡写真である。

第8図は、本発明の実施の形態5におけるバイオセンサの構成を示す斜視図である。

第9図は、本発明の実施の形態5におけるバイオセンサの測定状態を示す模式図である

第10図は、本発明の実施例の2種類の免疫クロマトグラフィー試験片における、hCG濃度と測定結果との関係を示すグラフである。

5

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について説明する。

実施の形態1.

本発明の実施の形態1によるバイオセンサ及びその製造方法は、展開層  
10 上を被検査溶液が均一な速度で浸透するようにしたものである。

まず、第1図を用いて、本実施の形態1におけるバイオセンサの構成について説明する。

第1図は、本実施の形態1における、溶融硬化により密閉したバイオセンサの構成を示す斜視図であり、第1(a)図は、該バイオセンサが展開層のみで構成されているものを示し、第1(b)図は、展開層の上部に液体不透過性シート材を配設したものを示し、第1(c)図は、展開層の上部に液体不透過性シート材、その下部に基板を配設したものを示している。  
15

第1図において、1は展開層上に被検査溶液を添加する添加部を示し、不織布で構成されている。2は展開層における反応部であり、ニトロセル  
20 ロースで構成されている。3は展開層上に浸透した溶液を吸収する吸水部を示し、ガラス繊維濾紙で構成されている。これら展開層に使用する材料は、被検査溶液により湿潤可能な材料であれば、濾紙、不織布、メンブレン、布などの任意の多孔質な材料で構成することができる。

また、4は標識試薬保持部であり、展開層上の一部に、被検査溶液中の  
25 測定対象物に対する抗体が、金コロイドで標識され、また被検査溶液により溶出可能なように乾燥状態で保持されている。5は試薬固定化部であり、被検査溶液中の測定対象物に対する抗体を固定化し、標識試薬とは異なるエピトープで結合し、被検査溶液中の測定対象物と、標識試薬との複合体



が形成できるように、乾燥状態で固定化されている。本実施の形態 1 においては、上記標識試薬保持部 4 及び試薬固定化部 5 は、展開層上の一部にスポット状に形成されており、特に上記被検査溶液添加方向に対する平行側面に試薬が接触しない構成を有している。なお、ここでは上記標識試薬保持部 4 及び試薬固定化部 5 の形状をスポット形状としたが、必ずしもスポット形状である必要はなく、上記標識試薬保持部 4 及び試薬固定化部 5 が上記展開層の平行側面に対して接触しない形状で形成されていればその形状は自在に選択できる。また、上記標識試薬保持部 4 及び試薬固定化部 5 を有する展開層の構成は、抗原抗体反応におけるサンドイッチ反応といわれるものであるが、試薬の選択により、被検査溶液中の測定対象物と競合的に反応する試薬を用いたならば、その展開層の構成を競合反応とすることもできる。また、抗原抗体反応以外にも、特異的な結合を利用したい場合、任意の試薬成分で構成することが可能である。また、標識方法についても、上述した金コロイドはほんの一例にすぎず、その他に酵素、タンパク質、色素、蛍光色素、金属ゾル、非金属ゾル、ラテックスなどの着色粒子などがあり、必要に応じて任意に選択することが可能である。

6 は液体不透過性シート材を示し、例えば、透明 PET テープで構成されている。この液体不透過性シート材 6 は、添加部 1 を除いた展開層を密着被覆するものであり、該液体不透過性シート材 6 を展開層の上述した部分に被覆させることで、被検査溶液の添加部 1 以外への点着を遮断保護するとともに、展開層に対する不用意な被検査溶液の接触や、被験者が手などで直接展開層を接触する等による外部からの汚染を防止することができる。この液体不透過性シート材 6 は、透明な材料を用いることが好ましく、特に、試薬固定化部 5 を覆う部分は測定結果を確認する部分であるから、少なくとも透過可能な状態をもたせることが好ましい。なお、バイオセンサが高精度な結果を必要としない場合や、形成した展開層を最終的に中空ケーシングなどに投入する場合には、上記液体不透過性シート材 6 はなくとも良い。

7は展開層を保持する基板を示し、例えば白色PETフィルムで構成されている。基板7は展開層を補強する役割をもつとともに、血液、唾液、尿など感染の危険性のある溶液を被検査溶液に用いる場合には、それを遮断する作用も有する。さらに、上記基板7は展開層が湿潤して光透過性を帯びる場合などに、光を遮断する効果をもたせることも可能である。なお、  
5 ここでは、展開層の下部に基板7を配設するようにしたが、基板7のかわりに液体不透過性シート材6で展開層の裏面を被覆するようにしてもよい。この場合も血液、唾液、尿など感染の危険性のある溶液を被検査溶液に用いる場合にはそれを遮断する作用を有し、さらにバイオセンサの材料数を  
10 削減することができるため、より低コスト化をはかることが可能となる。

8は溶融硬化部を示し、上記展開層の平行側面をCO<sub>2</sub>レーザにより溶融させ、その後冷却により硬化させて形成したものである。本実施の形態1においては、上記展開層の平行側面に上記標識試薬保持部4及び試薬固定化部5が接触していないので、その側面を溶融させても上記標識試薬保持部4及び試薬固定化部5は影響を受けることはない。従って、上記標識試薬保持部4及び試薬固定化部5の試薬量を最小限にすることが可能となり、試薬が高価な場合や微量しかない場合に有効的である。また、本実施の形態1では、溶融方法としてCO<sub>2</sub>レーザを用いたが、その他にも、エキシマレーザ、アルゴンレーザ、YAGレーザ、ヘリウムネオンレーザ、  
20 ルビーレーザなどを用いることができる。また、レーザ以外にも、金属などを加熱して接触させることで、上記展開層の平行側面を溶融させることも可能であり、さらに、上記展開層の材料によっては、有機溶剤などにより溶融させることもできる。なお、上述した溶融方法は一例であり、上記展開層の平行側面を溶融させることができれば、任意の方法でよい。

25 次に、以上のような構成を有する本実施の形態1におけるバイオセンサの測定方法について、第1図を用いて説明する。本実施の形態1で例に挙げるバイオセンサは、ワンステップ免疫クロマトグラフィーの試験片であり、使用の際の基本的な測定操作が、被検査溶液を添加する操作のみで、その

測定が開始されるものである。ここでの免疫クロマトグラフィとは、湿潤可能な多孔質材料を用いて、固定化試薬と標識試薬の複合体を形成させることにより測定される免疫測定法のことを示し、抗原抗体反応を利用した測定系で、通常免疫測定法においてはB/F分離など洗浄操作が必要なことに  
5 対して、クロマトグラフィ担体を被検査溶液が浸透していく過程でB/F分離が実施される測定系である。また、このような免疫クロマトグラフィにおいては、通常すべての試薬が乾燥状態にあり、その試薬を標識する標識物としては、金コロイド、ラテックスが一般的であり、磁性粒子、酵素、金属コロイド等も使用されている。なお、標識物が酵素の場合等は、

10 使用者が測定操作として酵素基質や反応停止試薬を加える操作が含まれる。

上述したような構成を有するバイオセンサの測定は、まず、被検査溶液を添加部1に適量添加することで開始する。被検査溶液を添加部1に添加すると、被検査溶液が展開層に浸透する。展開層は溶融硬化部8によりその側面が密閉されているため、側面における被検査溶液の浸透速度は速く  
15 なることはなく、均一な速度で浸透していく。そして、標識試薬保持部4に被検査溶液が到達すると、該標識試薬保持部4に保持された標識試薬の溶出が開始する。その後、被検査用溶液の浸透が進み、試薬固定化部5に被検査溶液が到達し、その後被検査溶液は吸水部3に吸収される。

そして、その測定結果は、ある一定時間経過後の試薬固定化部5における標識試薬の結合状態を確認することで得られる。本実施の形態1では、  
20 上記展開層の平行側面に上記標識試薬保持部4及び試薬固定化部5が接触しておらず、さらにその平行側面を溶融密閉されているため、試薬固定化部5において被検査溶液の均一な浸透が行われ、該試薬固定化部5を通過する標識試薬、及び被検査溶液中の測定対象物が、試薬固定化部5の各面  
25 を均一に浸透し、部分的な結合量の差が解消されて、精度の高い均一な測定結果を得ることができる。

また、上記試薬固定化部5における標識試薬の結合状態を測定する方法は、定性判定が必要な場合は目視によって可能であり、さらに精度の高い

測定が必要な場合は、光学的な手法を用いて、その標識試薬の結合量を測定することで、定量的な結果を得ることができる。なお、本実施の形態 1 では、上記試薬固定化部 5 の形状を被験者が確認しやすい形状にすることが可能であるため、該試薬固定化部 5 における標識試薬の結合状態を測定 5 する方法としては、目視判定等に適しているといえる。

以上のように、本実施の形態 1 によるバイオセンサ及びその製造方法によれば、展開層上の一部に該平行側面と接触しないように上記標識試薬保持部 4 及び試薬固定化部 5 をスポット状等に形成し、該展開層上の被検査溶液が浸透する方向に対して、上記平行側面の一部分または全体を熔融硬化 10 化して密閉するものとしたので、展開層における被検査溶液の浸透を整えることができ、より精度の高い定量測定を可能にすることができる。また、展開層そのものを熔融硬化させるので、平行側面を密閉させるための新たな材料を必要とすることなく、また製造過程を簡略化することができ、材料削減と製造工数の削減とにより低コスト化を図ることができる。

15 また、展開層の原料としてタンパク質などの結合が比較的容易なニトロセルロースを用いることで、バイオセンサの作製を容易にすることができる。

また、展開層の平行側面をレーザにより熔融硬化して密閉することで、平行側面の必要な部分を、より高速に、しかも均一に熔融硬化させること 20 ができ、さらに、熔融硬化させた部分に均一性をもたせることができる。また、展開層の側面を、物理的に非接触状態で熔融硬化させることを可能にし、展開層の接触圧による形状変化が生じないようにでき、この結果、高精度な測定を可能にすることができる。

なお、本実施の形態 1 においては、抗原抗体反応を利用したバイオセン 25 サを例に挙げて説明したが、抗原抗体反応以外にも特異的結合反応系であれば、同様に実施可能である。また、その測定操作についても、被検査溶液の添加操作により測定がなされるワンステップのものにかぎらず、例えば、被検査溶液の添加以外に標識物が酵素であって反応停止試薬等を添加

する必要があったり、検体を希釈する必要がある等、その測定操作に複数の操作を必要とする場合であっても、同様に実施可能である。

#### 実施の形態 2.

5 本発明の実施の形態 2 によるバイオセンサ及びその製造方法は、上記展開層上の被検査溶液を浸透させる方向に対して平行側面の、上記標識試薬保持部 4 及び試薬固定化部 5 の試薬成分を変性失活させるものである。

まず、第 2 図を用いて、本実施の形態 2 におけるバイオセンサの構成について説明する。

10 第 2 図は、本実施の形態 2 における、展開層の平行側面の試薬成分を変性失活させた状態のバイオセンサを示す斜視図であり、第 2 (a) 図は、該バイオセンサが展開層のみで構成されるものを示し、第 2 (b) 図は、展開層の上部に液体不透過性シート材を配設したものを示し、第 2 (c) 図は、展開層の上部に液体不透過性シート材、下部に基板を配設したものを示している。

15 第 2 図において、本実施の形態 2 のバイオセンサは、実施の形態 1 と同様、ワンステップ免疫クロマトグラフィの試験片であり、展開層上に標識試薬保持部 4 及び試薬固定化部 5 が形成されている。ただし、本実施の形態では、上記標識試薬保持部 4 及び試薬固定化部 5 が帯状に形成されており、上記展開層上の被検査溶液の添加方向に対する平行側面に試薬が接触する構成をとっている。そして、9 は試薬失活部を示し、展開層の標識試薬保持部 4 の側面部分と、試薬固定化部 5 の側面部分とを、CO<sub>2</sub>レーザにより失活させたものである。また、展開層の側面の試薬成分を失活させるには、その側面部分周辺を均一に失活させる方法が好ましく、加熱した金属面を側面に接触させることにより失活させる方法や、酸、アルカリなどのタンパク質を変性させる溶液を塗布及び噴霧する方法などがあげられる。なお、第 2 図において、第 1 図と同一部分については同じ符号を付して説明を省略する。

20

25

次に、このような構成を有する本実施の形態 2 におけるバイオセンサの

測定方法について、第2図を用いて説明する。

まず、上記バイオセンサの測定は、被検査溶液を添加部1に適量添加することにより開始する。被検査溶液を添加部1に添加すると、展開層上を被検査溶液が浸透する。標識試薬保持部4に被検査溶液が浸透すると、標識試薬の溶出が開始される。しかし、標識試薬保持部4における、展開層側面の標識試薬は失活されているため、該標識試薬は溶出しないか、または、その特異的な性質を失っている。ここでの特異的な性質とは、例えば抗原抗体反応の様な特異的な結合反応もしくは、標識試薬保持部4における標識試薬に酵素などを用いた場合等の特異的な反応をいう。

10 続いて、展開層の被検査溶液の浸透が進み、試薬固定化部5に被検査溶液が到達し、その後、被検査溶液は吸水部3で吸収される。この試薬固定化部5においても、展開層側面の試薬は変性失活されているため、試薬固定化部5の側面部での反応は起こらない。

このような上記展開層における被検査溶液の浸透は、機械的な操作を用いないため、展開層の性質に従って行われるものである。そして、その展開層の側面は、展開層中の細孔が寸断された状態にあり、その形状は中央部分とは異なっていることをふまえると、展開層の両側面と中央部とでは浸透速度に変化が生じることになる。従って本実施の形態2においては、上述したように展開層側面の試薬を変性失活させて、展開層の側面部では  
15 反応がおこらないようにし、上記被検査溶液の浸透が不均一な部分である試薬固定化部5の側面における標識試薬結合を除くことができる。なお、ここでの細孔は、展開層中の多孔をいい、また展開層の中央部とは、側面以外の部分を示す。

そして、上述したバイオセンサでの測定結果は、ある一定時間経過後の  
25 試薬固定化部5における、標識試薬の結合状態を確認することで得られる。この上記試薬固定化部5における標識試薬の結合状態を測定する方法は、定性判定が必要な場合は目視によって可能であり、さらに精度の高い測定が必要な場合は、光学的な手法を用いて、その標識試薬の結合量を測定す

ることで、定量的な結果を得ることができる。

以上のように、本実施の形態 2 によるバイオセンサ及びその製造方法によれば、展開層上に上記標識試薬保持部 4 及び試薬固定化部 5 を帯状に形成し、該展開層上の標識試薬保持部 4 の平行側面と試薬固定化部 5 の平行側面とを変性失活したので、展開層の側面部において反応がおこらないようにすることができ、不均一な被検査溶液の浸透に起因する測定精度の低下を防止することができる。

また、上記展開層の試薬失活部 9 は、レーザを照射することにより非接触でその試薬成分を変性失活させるようにしたので、変性失活する工程において、接触圧による上記展開層の形状変化を生じさせないようにすることができ、上記展開層の形状変化による浸透の不均一を防止でき、その結果、高精度のバイオセンサを作製することができる。

実施の形態 3.

本発明の実施の形態 3 による、バイオセンサ及びその製造方法は、展開層上を被検査溶液が均一な速度で浸透するようにしたものであり、上記展開層の被検査溶液の浸透方向に対する平行側面を熔融硬化して密閉すると、上記展開層上に帯状に形成された標識試薬保持部 4 及び試薬固定化部 5 の、上記平行側面部分の試薬成分を変性失活するのが同時に行われるものである。

まず、第 3 図を用いて、本実施の形態 3 におけるバイオセンサの構成について説明する。

第 3 図は、本実施の形態 3 における、展開層の平行側面を熔融硬化によって密閉し、且つその試薬成分を変性失活させたバイオセンサの構成を示す斜視図であり、第 3 (a) 図は、該バイオセンサが展開層のみで構成されているものを示し、第 3 (b) 図は、展開層の上部に液体不透過性シート材を配設したものを示し、第 3 (c) 図は、展開層の上部に液体不透過性シート材、その下部に基板を配設したものを示している。

第 3 図において、本実施の形態 3 のバイオセンサは、実施の形態 2 と同

様、上記標識試薬保持部 4 及び試薬固定化部 5 が帯状に形成されたものであり、この展開層上の被検査溶液添加方向に対して平行である側面全体に  $\text{CO}_2$  レーザ等を照射して、該平行側面を熔融硬化させて密閉する（熔融硬化部 8）と同時に、該平行側面の試薬成分を変性失活させた（試薬失活部 9）ものである。なお、第 3 図において、第 2 図と同一部分については同じ符号を付して説明を省略する。

次に、このような構成を有する本実施の形態 3 におけるバイオセンサの測定方法について、第 3 図を用いて説明する。

まず、上記バイオセンサの測定は、被検査溶液を添加部 1 に適量添加することにより開始する。被検査溶液を添加部 1 に添加すると、展開層上を被検査溶液が浸透する。上記展開層は、熔融硬化部 8 によりその側面が密閉されているため、その側面の浸透速度が速くなることはなく、均一な速度で浸透することができる。そして、標識試薬保持部 4 に上記被検査溶液が浸透すると、標識試薬の溶出が開始される。しかし、標識試薬保持部 4 における、展開層側面の標識試薬は失活されているため、該標識試薬は溶出しな

10 りないか、または、その特異的な性質を失っている。ここでの特異的な性質とは、例えば抗原抗体反応の様な特異的な結合反応もしくは、標識試薬保持部 4 における標識試薬に酵素などを用いた場合等の特異的な反応をいう。

20 続いて、その後展開層の被検査溶液の浸透が進み、試薬固定化部 5 に被検査溶液が到達し、その後、被検査溶液は吸水部 3 で吸収される。この試薬固定化部 5 においても、展開層側面の試薬は変性失活されているため、



試薬固定化部 5 の各面を均一に浸透し、部分的な結合量の差が解消されて、精度の高い均一な測定結果を得ることができる。さらに、本実施の形態 3 においては、上記展開層の標識試薬保持部 4 及び試薬固定化部 5 の平行側面を変性失活させているため、該展開層の平行側面と中央部とにおける浸透速度の変化による、試薬固定化部 5 における被検査溶液の浸透の不均一を、該試薬固定化部 5 の側面で標識試薬結合をおこさないようにすることで解消することができ、より精度の高い均一な測定結果を得ることが可能となる。なお、ここでの展開層の中央部とは、側面以外の部分を示す。また、上記試薬固定化部 5 における標識試薬の結合状態を測定する方法は、  
10 定性判定が必要な場合は目視によって可能であり、さらに精度の高い測定が必要な場合は、光学的な手法を用いて、その標識試薬の結合量を測定することで、定量的な結果を得ることができる。

以上のように、本実施の形態 3 によるバイオセンサ及びその製造方法によれば、展開層上に上記標識試薬保持部 4 及び試薬固定化部 5 を帯状に形成し、該展開層上の被検査溶液が浸透する方向に対して、平行側面の一部  
15 分または全体を溶融硬化して密閉すると同時に、該平行側面の上記標識試薬保持部 4 及び試薬固定化部 5 における試薬成分を変性失活させるので、被検査溶液の上記展開層への浸透を整え、さらに上記試薬固定化部 5 における平行側面への浸透による精度悪化を解消し、より精度の高い定量測定  
20 を可能にすることができる。また、展開層そのものを溶融硬化させるので、平行側面を密閉させるための新たな材料を必要とすることなく、また製造過程を簡略化することができ、材料削減と製造工数の削減とにより低コスト化を図ることができる。

また、展開層の原料としてタンパク質などの結合が比較的容易なニトロ  
25 セルロースを用いることで、バイオセンサの作製を容易にすることができる。

また、展開層の平行側面をレーザにより溶融硬化して密閉することで、平行側面の必要な部分を、より高速に、しかも均一に溶融硬化させること

ができ、さらに、熔融硬化させた部分に均一性をもたせることができる。  
また、展開層の側面を、物理的に非接触状態で熔融硬化させることを可能にし、展開層の接触圧による形状変化が生じないようにでき、この結果、高精度な測定を可能にすることができる。

5 実施の形態 4.

本発明の実施の形態 4 におけるバイオセンサ及びその製造方法は、バイオセンサを製造する際に 1 つの工程で、切断し、その切断面を密閉するようにしたものである。

以下、第 4 図及び第 5 図を用いて、本実施の形態 4 におけるバイオセンサの製造工程について説明する。

第 4 図は、本実施の形態 4 のスポット状の試薬固定化部を有するバイオセンサの切断工程の前後における A-A' 断面図であり、第 4 (a) 図は、切断する前の状態を示し、第 4 (b) 図は、切断した後の状態を示している。また、第 5 図は、本実施の形態 4 の帯状の試薬固定化部を有するバイオセンサの切断工程の前後における A-A' 断面図であり、第 5 (a) 図は、切断する前の状態を示し、第 5 (b) 図は、切断した後の状態を示している。なお、第 4 図及び第 5 図は、第 1 (c) 図及び第 3 (c) 図の A-A' 断面を示すものであり、第 1 図及び第 3 図と同一部分については同じ符号を付して説明を省略する。

第 4 (a) 図において、バイオセンサは、展開層と液体不透過性シート材 6 と基板 7 とがシート状で形成されている。ここでのシート状とは、第 4 (a) 図に示すようにバイオセンサが複数連なった切断前の状態をいう。そして、本実施の形態 4 においては、第 4 (a) 図のシート状のバイオセンサを、ここでは CO<sub>2</sub> レーザを用いて切断し、1 枚のシート状バイオセンサから第 4 (b) 図に示すような複数のバイオセンサを作製する。また本実施の形態 4 におけるバイオセンサの製造工程では、シート状バイオセンサが切断されると同時に、その側面が第 4 (b) 図に示されているように熔融硬化されて熔融硬化部 8 が形成されるようになっており、1 つの工

程で、切断し、且つその切断面を密閉することができる。

また、第5(a)図においても同様に、バイオセンサはシート状に形成され、第5(a)図のシート状のバイオセンサを、ここではCO<sub>2</sub>レーザを用いて切断し、1枚のシート状バイオセンサから第5(b)図に示すような複数のバイオセンサを作製する。なお、第5図においては、上記標識試薬保持部4及び試薬固定化部5が帯状に形成されているため、1つの工程で、切断し、且つその切断面を密閉すると同時に、上記標識試薬保持部4及び試薬固定化部5の側面の試薬成分が変性失活されることとなり、一つの切断工程で、上記バイオセンサに溶融硬化部8と試薬失活部9とが形成することができる。

ここで、第6図及び第7図を用いて、本実施の形態4の製造工程によるバイオセンサの断面状態と、従来の製造工程によるバイオセンサの断面状態とを比較する。第6図は、従来の切断方法でバイオセンサを切断した場合における、被検査溶液浸透方向に対して平行側面の顕微鏡写真を示し、第7図は、本実施の形態4の切断方法で切断した場合における、被検査溶液の浸透方向に対して平行側面の顕微鏡写真を示す。

CO<sub>2</sub>レーザを用いて切断すると同時にその断面を溶融硬化する、本実施の形態4の製造工程によって作製されたバイオセンサ側面は、第7図に示すように、バイオセンサの側面が溶硬化され密閉されていることがわかる。一方、刃物により切断する、従来の製造工程によって作製されたバイオセンサの側面は、第6図に示すように、刃物の接触により展開層の側面がダメージを受けて形状が変化していることがわかる。

また、上述した第6図と第7図とを対比すると、第6図の展開層の側面は変形しているのに対して、第7図の展開層の側面は多孔質の状態のまま保持されており、溶融硬化された密閉状態であることが確認できる。

以上のように、本実施の形態4によるバイオセンサ及びその製造方法によれば、シート状のバイオセンサをレーザで切断すると同時に、その切断面を溶融硬化して密閉するものとしたので、バイオセンサの製造工程に

において、切断する工程と別工程で密閉する操作を必要とせず、簡易かつ低コストでしかも高精度なバイオセンサを提供することができる。

実施の形態 5.

- 5 本発明の実施の形態 5 によるバイオセンサ及びその製造方法は、高精度、高正確性の精度を持ちながら、低コスト化、製造工程の簡略化を図るべく、展開層を単一部材とし、なおかつ、吸水部等をなくし、展開層の始端及び終端の液体不透過性シートを除いたものである。

まず、第 8 図を用いて、本実施の形態 5 におけるバイオセンサの構成について説明する。

- 10 第 8 図は、本実施の形態 5 における溶融硬化により密閉したバイオセンサを示す斜視図であり、第 8 (a) 図は、展開層の上部に液体不透過性シート材を配設したものを示し、第 8 (b) 図は、展開層の上部に液体不透過性シート材、その下部に基板を配設したものを示している。

- 15 第 8 図において、1 は展開層上に被検査溶液を添加する添加部を示し、反応部 2 と同一部材である。2 は展開層における反応部であり、ニトロセルロースで構成されている。10 は上記展開層における、液体不透過性シートで覆われていない、終端開放部を示す。これら、展開層に使用する材料は、被検査溶液により湿潤可能な材料であれば、濾紙、不織布、メンブレン、布などの任意の多孔質な材料で構成することができる。

- 20 バイオセンサの低コスト化、及びその製造工程の簡略化を目的とした場合には、展開層は一つの部材で構成されることが好ましく、さらに、被検査溶液が微量 ( $100 \mu\text{L}$  以下)、もしくは極微量 ( $10 \mu\text{L}$  以下) の場合であっても、上記被検査溶液を展開層において展開させる必要があるので、展開層は厚みが薄い材料が好ましい。従って、展開層の材料としては、ニトロセルロース等のメンブレンを用いることが好ましい。

25 また、4 は標識試薬保持部であり、展開層上の一部に、被検査溶液中の測定対象物に対する抗体が、金コロイドで標識され、また被検査溶液により溶出可能なように乾燥状態で保持されている。5 は試薬固定化部であり、

- 被検査溶液中の測定対象物に対する抗体を固定化し、標識試薬とは異なるエピトープで結合し、被検査溶液中の測定対象物と、標識試薬との複合体が形成できるように、乾燥状態で固定化されている。上述した展開層の構成は、抗原抗体反応におけるサンドイッチ反応といわれるものであるが、
- 5 試薬の選択により、被検査溶液中の測定対象物と競合的に反応する試薬を用いたならば、競合反応とすることもできる。また、抗原抗体反応以外にも、特異的な結合を利用したい場合、任意の試薬成分で構成することが可能である。また、標識方法についても、上述した金コロイドはほんの一例にすぎず、その他に酵素、タンパク質、色素、蛍光色素、金属ゾル、非金属ゾル、ラテックスなどの着色粒子などがあり、必要に応じて任意に選択
- 10 することが可能である。

- バイオセンサの高精度化、低コスト化、及びその製造工程の簡略化を目的とした場合、上記両試薬成分は、同一部材に保持もしくは固定化されており、添加部 1、反応部 2、吸水部 3 が別々の部材ではなく、1つの部材
- 15 であり、なおかつ上記両試薬成分が同一平面上の異なる部分に配設されることが好ましい。

- また、6 は液体不透過性シート材を示し、例えば、透明 P E T テープで構成されている。この液体不透過性シート材 6 は、添加部 1 と展開層の終端開放部 10 とを除いた展開層を密着被覆するものであり、該液体不透過
- 20 性シート材 6 を展開層の上述した部分に被覆させることで、被検査溶液の添加部 1 及び終端開放部 10 以外への点着を遮断保護するとともに、展開層に対する不用意な被検査溶液の接触や、被験者が手などで直接展開層を接触する等による外部からの汚染を防止することができる。この液体不透過性シート材 6 は、透明な材料を用いることが好ましく、特に、試薬固定
- 25 化部 5 を覆う部分は測定結果を確認する部分であるから、少なくとも透過可能な状態をもたせることが好ましい。さらに、展開層を浸透していく被検査溶液に、浸透均一性を持たせることで高精度な測定結果を得るためには、液体不透過性シート材 6 が展開層に対して密着被覆されていることが

好ましい。

7は展開層を保持する基板を示し、例えば白色PETフィルムで構成されている。基板7は展開層を補強する役割をもつとともに、血液、唾液、尿など感染の危険性のある溶液を被検査溶液に用いる場合には、それを遮断する作用も有する。さらに、上記基板7は展開層が湿潤して光透過性を帯びる場合などに、光を遮断する効果をもたせることも可能である。

8は溶融硬化部を示し、上記展開層の側面をCO<sub>2</sub>レーザーにより溶融させ、その後冷却により硬化して形成したものである。なおここでは、溶融方法としてCO<sub>2</sub>レーザーを用いたが、その他にも、エキシマレーザー、アルゴンレーザー、YAGレーザー、ヘリウムネオンレーザー、ルビーレーザーなど用いることができる。また、レーザー以外にも、金属などを加熱して接触させることで、上記展開層の平行側面を溶融させることも可能であり、さらに、上記展開層の材料によっては、有機溶剤などにより溶融させることもできる。また、上述した溶融方法は一例であり、上記展開層の平行側面を溶融させることができれば、任意の方法でよい。

次に、以上のように構成された、本実施の形態5におけるバイオセンサの測定方法について、第9図を用いて説明する。

第9図は、本実施の形態5におけるバイオセンサの測定状態を示す模式図である。

上記バイオセンサの測定は、まず、被検査溶液11を、添加部1に適量添加することで開始される(第9(a)図)。被検査溶液11を添加部1に添加すると、被検査溶液11が展開層を浸透する(第9(b)図)。上記展開層は溶融硬化部8によりその側面が密閉されているため、その側面における被検査溶液11の浸透速度は速くなることはなく、展開層を均一な速度で浸透していく。そして、標識試薬保持部4に被検査溶液11が到達すると、該標識試薬保持部4に保持された標識試薬の溶出が開始する。その後、被検査用溶液11の浸透が進み、試薬固定化部5に被検査溶液11が到達し、その後、終端開放部10に到達する(第9(c)図)。終端開放部

10に到達した被検査溶液11は、蒸発12により乾燥され、さらには、水頭差の関係で、添加部1にある被検査溶液11と同じ高さまで滲出する(第9(d)図)。

このことにより、本バイオセンサは、余分な被検査溶液11を吸収する  
5 ための新たな材料を必要とせず、また、被検査溶液11を展開層において添加部1方向から終端開放部10方向へと、一定方向に浸透させることができる。なお、本実施の形態4では、添加部1及び終端開放部10は、露出開放されたままの状態である場合を示したが、必要に応じて、例えば被検査溶液11が汚染性物質である場合には、使用者の手に被検査溶液11  
10 が付着しないように、添加部1及び終端開放部10を保護材料で構成することや、上記構成を有する展開層を中空ケーシングに投入することも可能である。

そして、その測定結果は、一定時間経過後の試薬固定化部5における標識試薬の結合状態を確認することで得られる。本発明においては、試薬固  
15 定化部5における展開層の平行側面を上述したようにして溶融密閉しているので、展開層における被検査溶液11の均一な浸透が行われるため、試薬固定化部5を通過する、標識試薬及び被検査溶液11中の測定対象物が、試薬固定化部5の各面を均一に浸透し、試薬固定化部5の中央部と側面部とでの標識試薬の結合量の差が解消されて、精度の高い均一な測定結果を  
20 得ることができる。

この試薬固定化部5における標識試薬の測定方法は、定性判定が必要な場合は目視によっても可能である。また、さらに精度の高い測定が必要な場合は光学的な手法を用いて、上記試薬固定化部5における標識試薬の結合量を測定することで、定量的な結果を得ることができる。

25 なお、本実施の形態5においては、上記展開層上に標識試薬保持部4及び試薬固定化部5を帯状に形成した場合を例に挙げて説明したが、上記標識試薬保持部4及び試薬固定化部5をスポット状に形成した場合についても同様である。

以上のように、本実施の形態5によるバイオセンサ及びその製造方法によれば、被検査溶液11が浸透する方向に対して、展開層の平行側面の一部、または全体部分を溶融硬化し密閉するものとしたので、被検査溶液11の浸透を整え、より精度の高い定量測定を可能にすることができると共に、液体不透過性シート材6によって、上記展開層の始端部分及び終端部分を除いた部分を密着被覆させることで、被検査溶液を添加する部分の部材、さらには、被検査溶液を吸水する部部の部材を不要にすることができる。

また、展開層そのものを溶融硬化させるので、平行側面を密閉させるのに新たな材料を必要とすることなく、製造過程を簡略化することができ、センサ性能を保持したまま、材料削減と製造工数の削減とによって、低コスト化を図ることができる。

また、展開層の原料としてタンパク質などの結合が比較的容易なニトロセルロースを用いることで、さらには、上記試薬成分を展開層と同一平面上に形成させることで、バイオセンサの作製を容易にすることができる。

また、展開層の平行側面をレーザにより溶融硬化し密閉することで、平行側面の必要な部分をより高速に、しかも均一に溶融硬化させることができ、さらに溶融硬化させた部分に均一性をもたせることができる。また、レーザにより溶融させることで、展開層に対して物理的に非接触で溶融硬化させることを可能にし、展開層の接触圧による形状変化が生じないようにでき、この結果、高精度な測定を可能にすることができる。

#### (実施例)

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明は、その要旨を越えない限りこれらの実施例の記載に限定されるものではない。

本実施例では、ニトロセルロース膜中に抗hCG- $\beta$ 抗体固定化ライン、および抗hCG- $\alpha$ 抗体と金コロイドとの複合体の広いバンドを含む免疫クロマトグラフィー展開層を以下のようにして製造し、上記免疫クロマトグラフィー展開層の上部に液体不透過性シート、その下部に基板を配設し



- た。その後、個々のセンサを形成させるために、CO<sub>2</sub>レーザを用いて切断した免疫クロマトグラフィ試験片と、刃物（スコアカッター）で切断した免疫クロマトグラフィ試験片とを作成し、それぞれの免疫クロマトグラフィ試験片を使用して尿中hCGの測定を行い、その測定値のばらつきを比較した。
- 5.

#### A. 免疫クロマトグラフィ展開層の調製

- まず、リン酸緩衝溶液にて希釈して、濃度調整を行った抗hCG-β抗体溶液を準備し、この抗体溶液を溶液吐出装置を用いて、ニトロセルロース膜上に塗布した。これにより、ニトロセルロース膜上に検出用の抗体固定化ラインが得られた。このニトロセルロース膜を乾燥後、1%スキムミルクを含有するTris-HCl緩衝溶液中に浸漬して30分間緩やかに振った。30分後、Tris-HCl緩衝溶液槽に膜を移動し、10分間緩やかに振った後に、別のTris-HCl緩衝溶液槽にて、さらに10分間緩やかに振り、膜の洗浄を行った。以上のような、2度の洗浄を行った後に、膜を洗浄液から取り出して、室温で乾燥させた。
- 10
- 15

- 金コロイドは、0.01%塩化金酸、還流中の100℃溶液に1%クエン酸溶液を加えることによって調製した。金コロイドは、還流を30分間続けた後に冷却し、0.2Mの炭酸カリウム溶液によってpH9に調製した。この金コロイド溶液に、抗hCG-α抗体を加えて数分間攪拌した後、10%BSA（牛血清アルブミン）溶液pH9を最終1%になる量だけ加えて攪拌することで、抗体金コロイド複合体（標識抗体）溶液を調製した。この標識抗体溶液を4℃、20000Gで50分間遠心分離することによって、標識抗体を単離して、それを洗浄緩衝液（1%BSA・リン酸緩衝液）中に懸濁した後に、遠心分離を行って、標識抗体を洗浄単離した。この標識抗体を洗浄緩衝液で懸濁して、0.8μmのフィルタにて濾過した後、当初の金コロイド溶液量の10分の1に調製して、4℃で貯蔵した。
- 20
- 25

以上のようにして作成された標識抗体溶液を溶液吐出装置にセットして、

抗hCG- $\beta$ 抗体固定化乾燥膜上の抗体固定化位置から離れた位置に塗布した後に、膜を乾燥させた。これによって、固定化膜上に標識抗体保持部位が得られた。

こうして免疫クロマトグラフィー展開層を完成させることができる。

#### 5 B. 免疫クロマトグラフィー試験片の作製

- 厚さ0.5mmの白色PETからなる基板の上に、上述したようにして作製した免疫クロマトグラフィー展開層を貼り付け、さらに、上部に、標識抗体保持部分から終端部分にかけて終端部には吸水部を積層する部分を開放し、厚さ100 $\mu$ mの透明PETからなる液体不透過性シートを張り付けた。その後、2.5mmの幅でCO<sub>2</sub>レーザを用いて裁断し展開層の側面を溶融硬化して密閉した免疫クロマトグラフィー試験片と、刃物（スコアッター）で裁断した免疫クロマトグラフィー試験片とを作製した。さらにそれぞれ終端部に、吸水部としてガラス繊維濾紙を貼り付けた。このようにして、2種類の免疫クロマトグラフィー試験片を製造することができる。なお本実施例では、吸水部としてガラス繊維濾紙を貼り付けているが、吸水部は必ずしも必要ではなく、上記被検査溶液を添加する始端及び終端を除いた上記免疫クロマトグラフィー展開層に対して液体不透過性シートを密着被覆させることで、上記展開層の終端部に吸水部と同様の効果を持たせることも可能である。つまり、展開層の終端部分を開放することによって、被検査溶液を蒸発させやすくし、且つ水頭差の関係で、上記展開層の終端に到達した被検査溶液の液面が、始端の液面と同様の高さになることを利用する。

#### C. 被検査溶液の調製

- ヒト尿中に既知濃度のhCG溶液を加えることにより、さまざまな既知濃度のhCG溶液を調製した。

#### D. 尿中hCGの測定方法

上述したようにして作製した2種類の免疫クロマトグラフィー試験片上の試料添加部に、hCGを含む尿を20 $\mu$ l以上添加して、吸水部方向へ

と展開処理し、抗原抗体反応をさせて抗体固定化部における呈色反応を行った。ここでは、試験片に試料を添加してから5分後の呈色状況を反射型分光光度計（CS9300；島津製作所製）を用いて計測して、呈色度を演算処理した。

5 第10図は、本発明の実施例の上記2種類の免疫クロマトグラフィー試験片における、hCG濃度と測定結果との関係を示すグラフであり、第10(a)図は、CO<sub>2</sub>レーザを用いて裁断した免疫クロマトグラフィー試験片の測定結果を示し、第10(b)図は、刃物（スコアカッター）で裁断した免疫クロマトグラフィー試験片の測定結果を示す。

10 まず、hCG濃度が100、1000、10000U/lの各hCGを含有する尿を免疫クロマトグラフィ試験片に添加し、展開処理を行った。そして、各hCG濃度の尿に対する試験片上の抗体固定化部の呈色状況を反射型分光光度計で測定した。本実施例では、520nmの波長における吸光度を反射型分光光度計で計測し、予め作成しておいたhCG濃度と吸光度との関係を示す検量線に代入し、換算値を得た。

15 その結果、第10(a)図に示される、CO<sub>2</sub>レーザを用いて裁断した試験片のCV値（変動係数）は3～10%を示し、第10(b)図に示される、刃物（スコアカッター）で裁断した試験片のCV値は20%～35%と大きなばらつきを示した。以上のことより、CO<sub>2</sub>レーザを用いて裁断した試験片の測定において、高精度な定量精度を有することを確認することができた。

#### 産業上の利用可能性

25 本発明にかかるバイオセンサ、及びその製造方法は、分析対象物である液体試料と標識試薬との反応結果の精度を向上させ、またそのような高精度バイオセンサの製造工程の簡略化、且つ低コスト化を実現するものとして極めて有用である。

## 請 求 の 範 囲

1. 被検査溶液を展開する展開層を備え、該展開層の一部に固定化された固定化試薬部分と、標識された乾燥状態で上記展開層の一部に保持され、
- 5 上記被検査溶液の展開により溶出可能な標識試薬部分とを含み、上記固定化試薬部分における上記標識試薬の結合量を測定することにより、上記被検査溶液中の測定成分を定性もしくは定量するバイオセンサにおいて、  
上記展開層の、上記被検査溶液の浸透方向に対して平行である側面の一部もしくは全体が、溶融硬化され密閉されている、
- 10 ことを特徴とするバイオセンサ。
2. 被検査溶液を展開する展開層を備え、該展開層の上記被検査溶液の浸透方向に対して平行側面を含む一部に固定化された固定化試薬部分と、  
標識された乾燥状態で上記展開層の浸透方向に対して平行側面を含む一部に保持され、上記被検査溶液の展開により溶出可能な標識試薬部分とを含み、
- 15 上記固定化試薬部分における上記標識試薬の結合量を測定することにより、上記被検査溶液中の測定成分を定性もしくは定量するバイオセンサにおいて、  
上記展開層は、上記被検査溶液の浸透方向に対して、上記標識試薬部分の平行側面と上記固定化試薬部分の平行側面とにおける試薬成分を変性失
- 20 活されている、  
ことを特徴とするバイオセンサ。
3. 請求の範囲第2項に記載のバイオセンサにおいて、  
上記展開層の、上記被検査溶液の浸透方向に対して平行である側面の一部もしくは全体が、溶融硬化され密閉されている、
- 25 ことを特徴とするバイオセンサ。
4. 請求の範囲第1項ないし請求の範囲第3項のいずれかに記載のバイオセンサにおいて、  
上記展開層の、上記被検査溶液を添加する一部を除いた表面、または表

面及び裏面が、液体不透過性シートで覆われており、

上記展開層及び上記液体不透過性シートの、上記被検査溶液の浸透方向に対して平行である側面の一部分もしくは全体が、熔融硬化され密閉されている、

5      ことを特徴とするバイオセンサ。

5.    請求の範囲第1項ないし請求の範囲第3項のいずれかに記載のバイオセンサにおいて、

上記展開層の、上記被検査溶液を添加する方向に対する始端及び終端の一部を除いた表面、または表面及び裏面が、上記液体不透過性シートで覆

10    われており、

上記展開層及び上記液体不透過性シートの、上記被検査溶液の浸透方向に対して平行である側面の一部分もしくは全体が、熔融硬化され密閉されている、

ことを特徴とするバイオセンサ。

15    6.    請求の範囲第1項ないし請求の範囲第3項のいずれかに記載のバイオセンサにおいて、

上記展開層はニトロセルロースで構成されている、

ことを特徴とするバイオセンサ。

20    7.    請求の範囲第1項ないし請求の範囲第3項のいずれかに記載のバイオセンサにおいて、

上記展開層の平行側面は、レーザによって熔融硬化され密閉される、

ことを特徴とするバイオセンサ。

8.    請求の範囲第1項ないし請求の範囲第3項のいずれかに記載のバイオセンサにおいて、

25    上記固定化試薬及び標識試薬を含む当該センサ全体が乾燥状態である、  
ことを特徴とするバイオセンサ。

9.    請求の範囲第1項ないし請求の範囲第3項のいずれかに記載のバイオセンサにおいて、

上記バイオセンサは、湿潤可能な多孔質材料上で上記固定化試薬と上記標識試薬との複合体を形成することにより測定が行われる免疫クロマトグラフィの試験片である、

ことを特徴とするバイオセンサ。

- 5 10. 請求の範囲第1項ないし請求の範囲第3項のいずれかに記載のバイオセンサにおいて、

上記バイオセンサは、湿潤可能な多孔質材料上で、上記被検査溶液の添加操作により測定がされるワンステップ免疫クロマトグラフィの試験片である、

- 10 ことを特徴とするバイオセンサ。

11. 請求の範囲第1項ないし請求の範囲第3項のいずれかに記載のバイオセンサにおいて、

上記固定化試薬と上記標識試薬とは、同一平面、かつ同一部材上に形成されている、

- 15 ことを特徴とするバイオセンサ。

12. 被検査溶液を展開する展開層を備え、該展開層の一部に固定化された固定化試薬部分と、標識された乾燥状態で上記展開層の一部に保持され、上記被検査溶液の展開により溶出可能な標識試薬部分とを含み、上記固定化試薬部分における上記標識試薬の結合量を測定することにより、上記被検査溶液中の測定成分を定性もしくは定量するバイオセンサを製造する方法において、

上記展開層の、上記被検査溶液の浸透方向に対して平行である側面的一部分もしくは全体を、溶融硬化して密閉する溶融工程を含む、

ことを特徴とするバイオセンサの製造方法。

- 25 13. 請求の範囲第12項に記載のバイオセンサの製造方法において、

上記溶融工程は、上記展開層の上記側面的一部分あるいは全体に、レーザーを照射することで行われる、

ことを特徴とするバイオセンサの製造方法。

14. 被検査溶液を展開する展開層を備え、該展開層の一部に固定化された固定化試薬部分と、標識された乾燥状態で上記展開層の一部に保持され、上記被検査溶液の展開により溶出可能な標識試薬部分とを含み、上記固定化試薬部分における上記標識試薬の結合量を測定することにより、上記被検査溶液中の測定成分を定性もしくは定量するバイオセンサを製造する方法において、

シート状である上記展開層を、上記被検査溶液の浸透方向に対して平行に切断すると同時に、該展開層の切断面を熔融硬化して密閉する、切断熔融工程を含む、

10. ことを特徴とするバイオセンサの製造方法。

15. 請求の範囲第14項に記載のバイオセンサの製造方法において、上記切断熔融工程は、上記シート状である展開層をレーザでトリミングすることで行われる、

ことを特徴とするバイオセンサの製造方法。

15. 16. 被検査溶液を展開する展開層を備え、該展開層の上記被検査溶液の浸透方向に対して平行側面を含む一部に固定化された固定化試薬部分と、標識された乾燥状態で上記展開層の浸透方向に対して平行側面を含む一部に保持され、上記被検査溶液の展開により溶出可能な標識試薬部分とを含み、上記固定化試薬部分における上記標識試薬の結合量を測定することにより、上記被検査溶液中の測定成分を定性もしくは定量するバイオセンサを製造する方法において、

上記標識試薬部分、及び上記固定化試薬部分の、上記被検査溶液の浸透方向に対して平行である側面における試薬成分を変性失活する変性失活工程を含む、

25. ことを特徴とするバイオセンサの製造方法。

17. 請求の範囲第16項に記載のバイオセンサの製造方法において、上記変性失活工程は、上記側面にレーザを照射することで行われる、ことを特徴とするバイオセンサの製造方法。

18. 被検査溶液を展開する展開層を備え、該展開層の上記被検査溶液の浸透方向に対して平行側面を含む一部に固定化された固定化試薬部分と、  
標識された乾燥状態で上記展開層の浸透方向に対して平行側面を含む一部に保持され、上記被検査溶液の展開により溶出可能な標識試薬部分とを含み、  
5 上記固定化試薬部分における上記標識試薬の結合量を測定することにより、上記被検査溶液中の測定成分を定性もしくは定量するバイオセンサを製造する方法において、

- 上記展開層の、上記被検査溶液の浸透方向に対して平行である側面的一部分もしくは全体を、溶融硬化して密閉すると同時に、上記標識試薬部分、  
10 及び上記固定化試薬部分の、上記被検査溶液の浸透方向に対して平行である側面における試薬成分を変性失活させる、溶融失活工程を含む、  
ことを特徴とするバイオセンサの製造方法。

19. 請求の範囲第18項に記載のバイオセンサの製造方法において、  
上記溶融失活工程は、上記側面にレーザを照射することで行われる、  
15 ことを特徴とするバイオセンサの製造方法。

20. 被検査溶液を展開する展開層を備え、該展開層の上記被検査溶液の浸透方向に対して平行側面を含む一部に固定化された固定化試薬部分と、  
標識された乾燥状態で上記展開層の浸透方向に対して平行側面を含む一部に保持され、上記被検査溶液の展開により溶出可能な標識試薬部分とを含み、  
20 上記固定化試薬部分における上記標識試薬の結合量を測定することにより、上記被検査溶液中の測定成分を定性もしくは定量するバイオセンサを製造する方法において、

- シート状である上記展開層を、上記被検査溶液の浸透方向に対して平行に切断すると同時に、該展開層の切断面を溶融硬化し、密閉、且つ、上記  
25 標識試薬部分、及び上記固定化試薬部分の、上記側面における試薬成分を変性失活させる、切断溶融失活工程を含む、  
ことを特徴とするバイオセンサの製造方法。

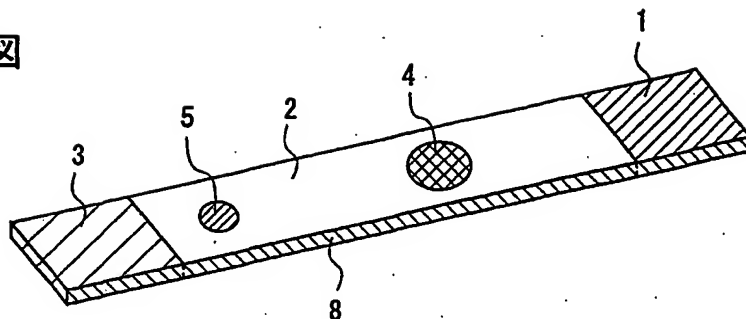
21. 請求の範囲第20項に記載のバイオセンサの製造方法において、



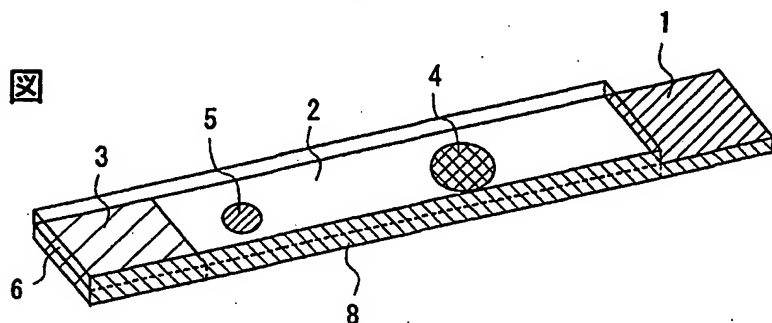
上記切断溶融失活工程は、上記シート状である展開層をレーザでトリミングすることで行われる、

ことを特徴とするバイオセンサの製造方法。

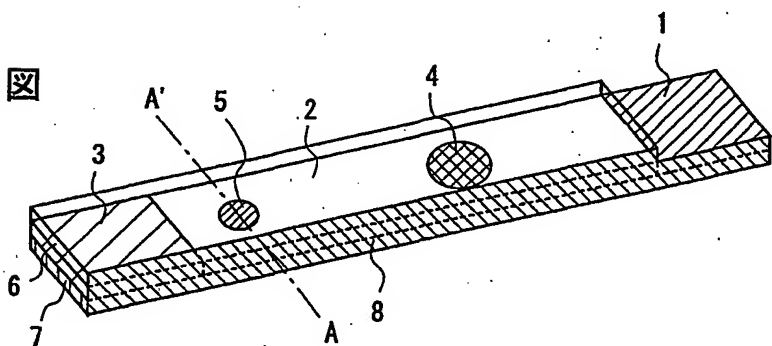
第1(a)図



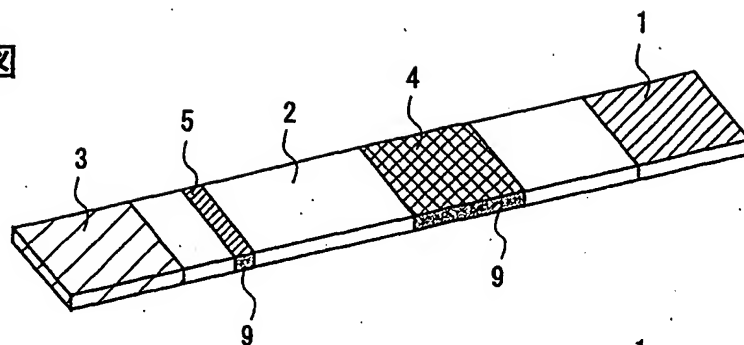
第1(b)図



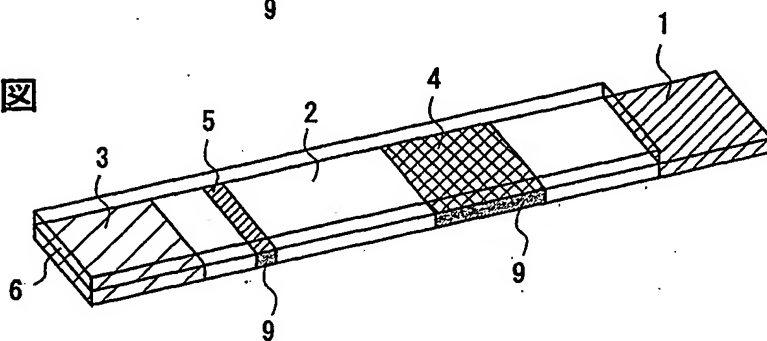
第1(c)図



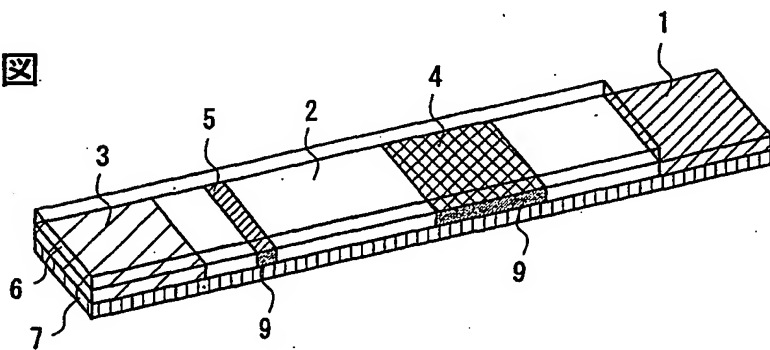
第2(a)図



第2(b)図

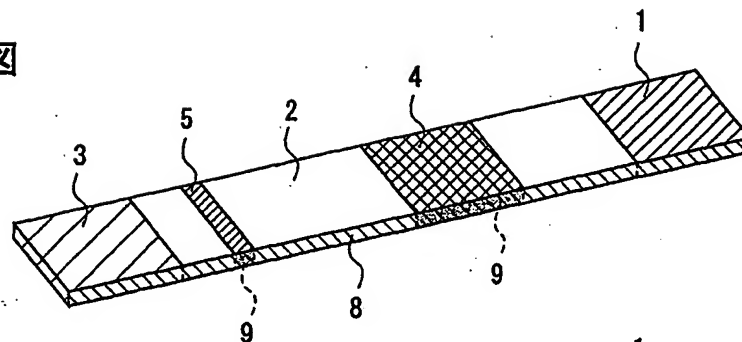


第2(c)図

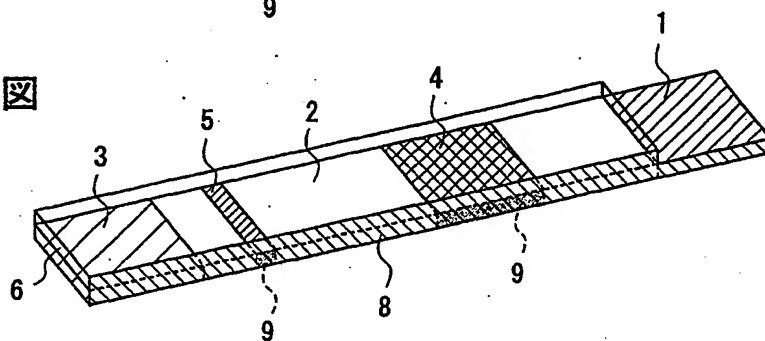


3/9

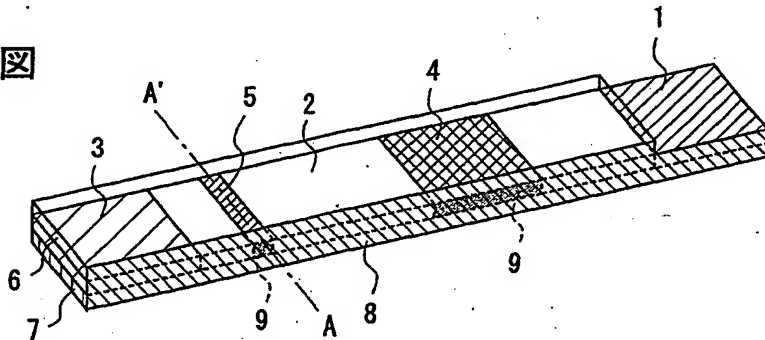
第3(a) 図



第3(b) 図

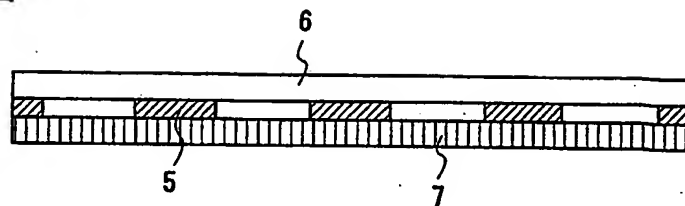


第3(c) 図

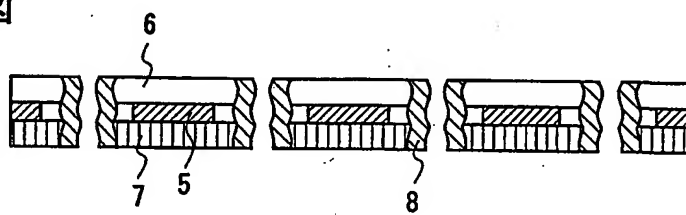


4/9

第4(a) 図

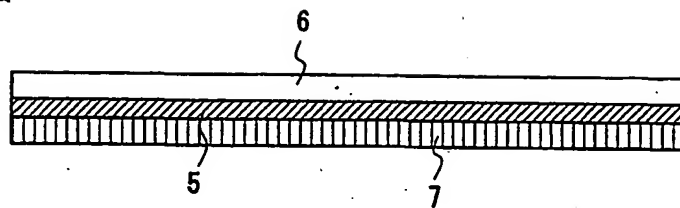


第4(b) 図

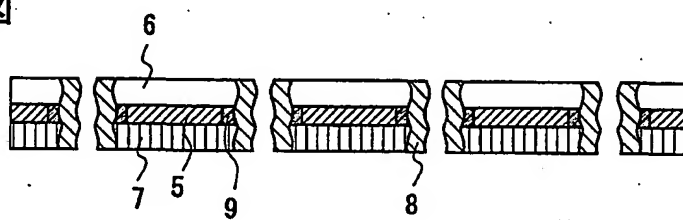


5/9

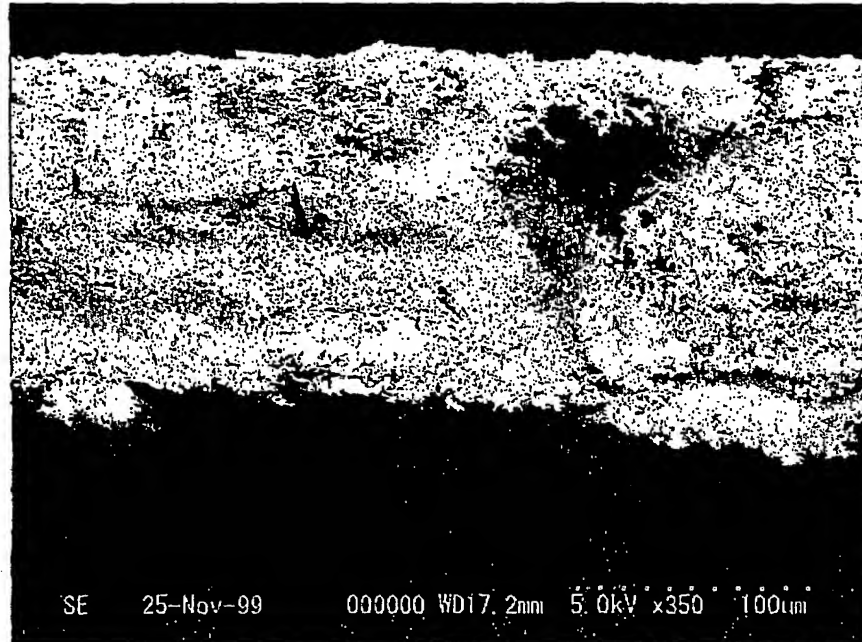
第5(a) 図



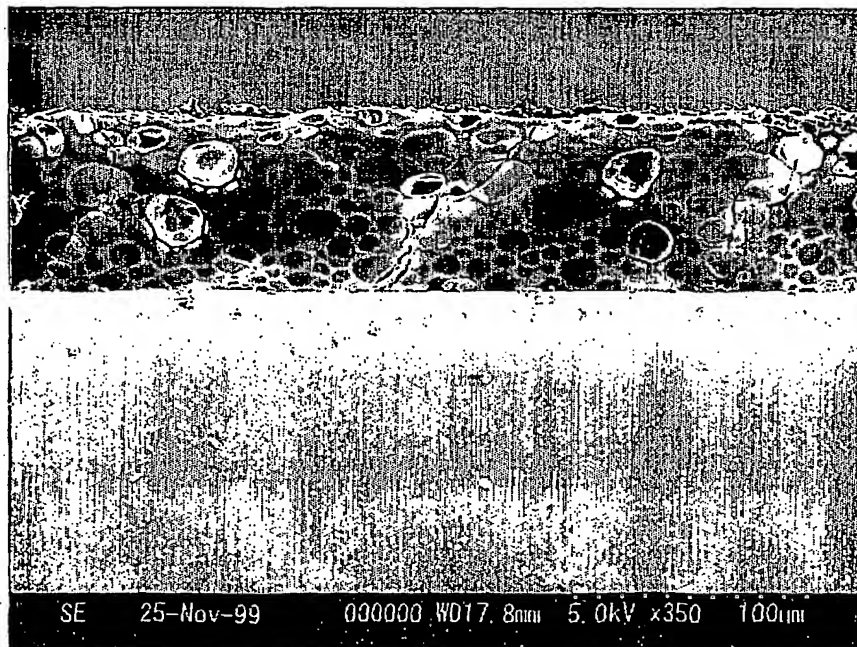
第5(b) 図



第6図

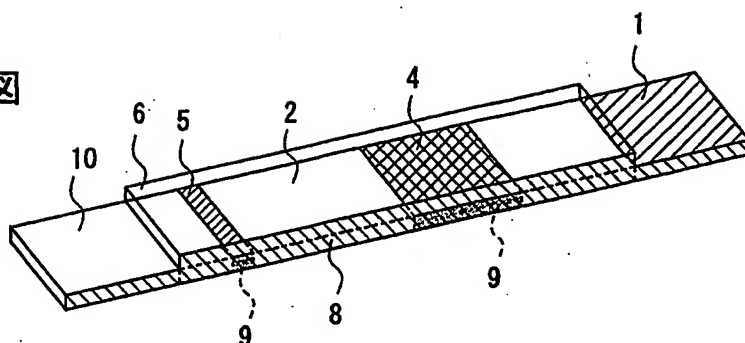


第7図

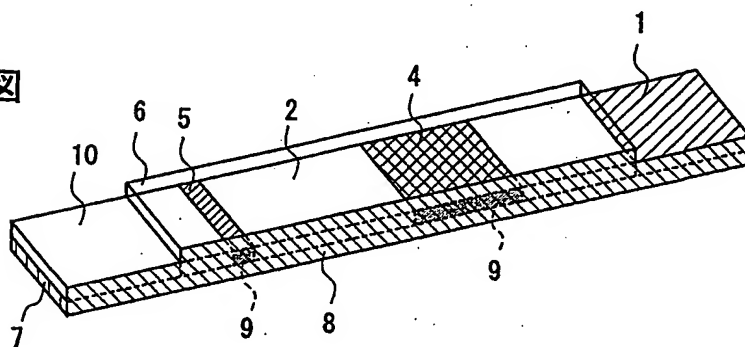


7/9

第8(a)図

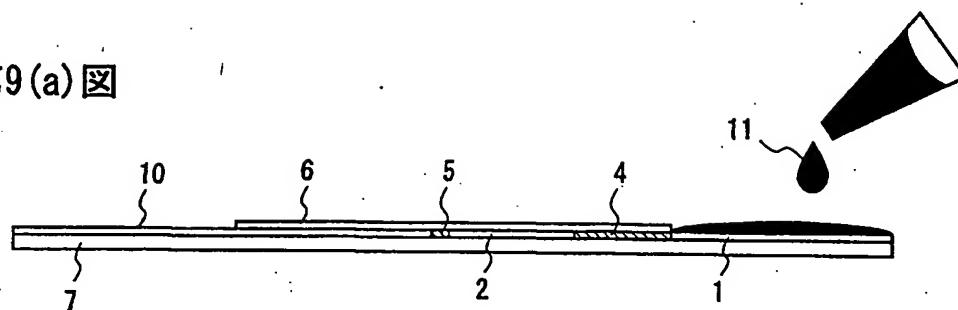


第8(b)図

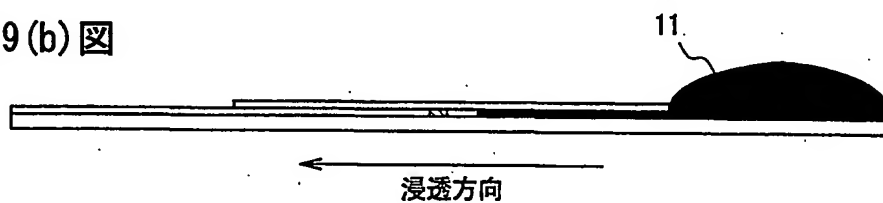




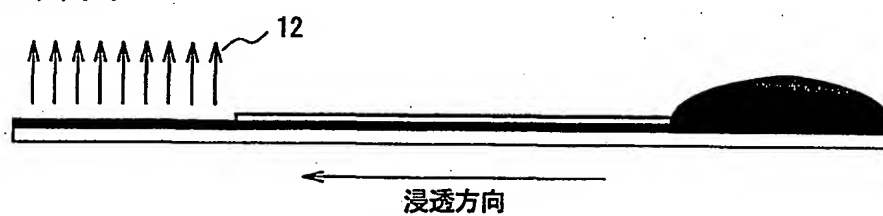
第9(a) 図



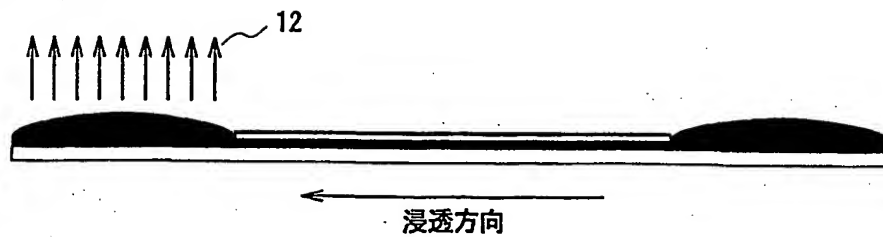
第9(b) 図



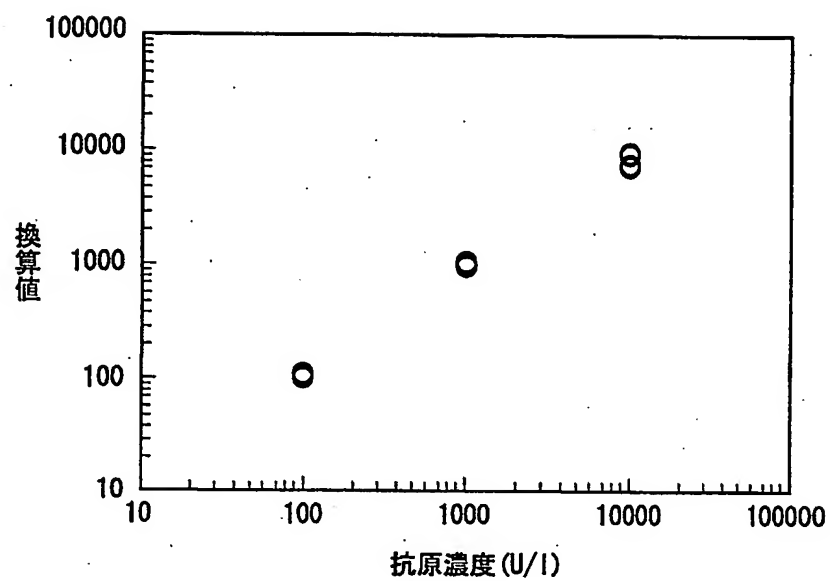
第9(c) 図



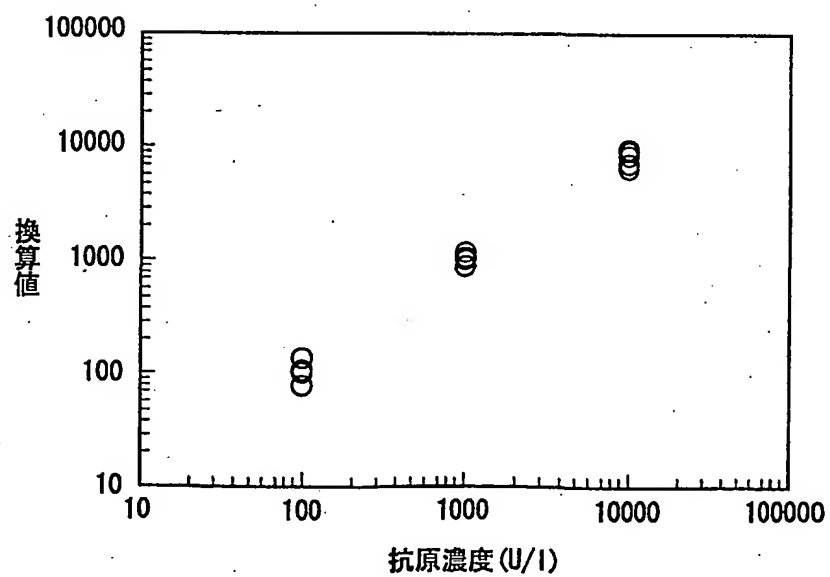
第9(d) 図



第10(a) 図



第10(b) 図



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04498

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> G01N 33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> G01N 33/543, G01N 31/22Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Jitsuyo Shinan Koho 1992-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2001  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2001 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2001

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 7-92156 A (Boehringer Mannheim GmbH), 07 April, 1995 (07.04.95), especially, Figs. 7 to 14	1, 3, 7, 8, 10-15
Y	& EP 571940 B & DE 59307620 G	4-6, 9
A	& US 5451350 A & ES 2109391 T	2, 10, 16-21
Y	JP 11-44689 A (Dainabot Co., Ltd.), 16 February, 1999 (16.02.99), & WO 99/ 5526 A & ZA 9806678 A & AU 9883583 A & EP 1003038 A & CN 1257581 A	4, 5
Y	JP 11-94817 A (Matsushita Electric Ind. Co., Ltd.), 09 April, 1999 (09.04.99) (Family: none)	4, 5
Y	JP 2000-55919 A (Nitto Denko Corporation), 25 February, 2000 (25.02.00), & EP 982590 A	6, 9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
23 July, 2001 (23.07.01)Date of mailing of the international search report  
31 July, 2001 (31.07.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.


Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04498

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 6-167497 A (Becton, Dickinson and Company), 14 June, 1994 (14.06.94), & EP 582231 A & AU 9344274 A & CA 2101472 A & FI 9303434 A & DK 9300882 A	8, 9
A	JP 62-22063 A (Miles Laboratories, Inc.), 30 January, 1987 (30.01.87), & EP 209032 B & AU 8659255 A & US 4776904 A & DE 3664066 G & CA 1267596 A	1-21

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>1</sup> G01N 33/543		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>1</sup> G01N 33/543 G01N 31/22		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
日本国実用新案公報 1992-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2001年 日本国登録実用新案公報 1994-2001年 日本国実用新案登録公報 1996-2001年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 7- 92156 A(ペーリンガー マンハイム ゲーエムベーハー), 7. 4月. 1995(07. 04. 95), 特に図 7-1 4,	1, 3, 7, 8, 10-15
Y	& EP 571940 B & DE 59307620 G & US 5451350 A	4-6, 9
A	& ES 2109391 T	2, 10, 16-21
Y	JP 11- 44689 A(ダイナボット株式会社), 16. 2月. 1999(16. 02. 99), & WO 99/ 5526 A & ZA 9806678 A & AU 9883583 A & EP 1003038 A & CN 1257581 A	4, 5
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	23. 07. 01	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 宮澤 浩 
		2 J 9407
		電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 11- 94817 A(松下電器産業株式会社), 9. 4月. 1999(09. 04. 99), (ファミリーなし)	4, 5
Y	JP 2000- 55919 A(日東電工株式会社), 25. 2月. 2000(25. 02. 00), & EP 982590 A	6, 9
Y	JP 6-167497 A(ベクトン ディッキンソン アンド カンパニー), 14. 6月. 1994(14. 06. 94), & EP 582231 A & AU 9344274 A & CA 2101472 A , & FI 9303434 A & DK 9300882 A	8, 9
A	JP 62- 22063 A(マイルズ ラボラトリース インコーポレーテ ド), 30. 1月. 1987(30. 01. 87), & EP 209032 B & AU 8659255 A & US 4776904 A & DE 3664066 G & CA 1267596 A	1-21